

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/25321 A1**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C08J 9/28, A61L 27/20, C12N 5/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09809
- (22) Internationales Anmeldedatum: 6. Oktober 2000 (06.10.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 48 120.2 6. Oktober 1999 (06.10.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): ALVITO BIOTECHNOLOGIE GMBH [DE/DE]; Im Biotechnologiepark, TGZ II, 14943 Luckenwalde (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAHNEMANN, Birger [DE/DE]; Eichhornstrasse 32, 15806 Zossen (DE). PAHMEIER, Andrea [DE/DE]; Eichhornstrasse 32, 15806 Zossen (DE). LÖTZBEYER, Thomas [DE/DE]; Siemensstrasse 8, 27574 Bremerhaven (DE).
- (74) Anwalt: HOFFMANN, Jörg, Peter; Müller & Hoffmann, Innere Wiener Strasse 17, 81667 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
— Mit internationalem Recherchenbericht.
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: 3D MATRIX FOR PRODUCING CELL TRANSPLANTS

(54) Bezeichnung: 3D-MATRIX ZUR HERSTELLUNG VON ZELLTRANSPLANTATEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing a biologically compatible matrix, to a matrix that can be obtained using the method, and to the use thereof. The invention also relates to an implant. The inventive matrix can be produced by dissolving, in water, chitosan in acid, by freezing the solution and by subsequently lyophilizing the same. Excess acid can be removed by neutralizing with a base before or after the lyophilization. The inventive matrix is dimensionally stable and elastic. When implanted, it induces only a minor immunoreaction.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer biologisch verträglichen Matrix, eine mit dem Verfahren erhältliche Matrix, sowie deren Verwendung. Ferner wird ein Implantat beschrieben. Die erfindungsgemässe Matrix wird erhalten, indem Chitosan im Säuren in Wasser gelöst wird, die Lösung eingefroren und anschliessend lyophilisiert wird. Überschüssige Säure kann vor oder nach dem Lyophilisieren durch Neutralisation mit Base entfernt werden. Die erfindungsgemässe Matrix ist formstabil und elastisch. Bei einer Implantation führt sie nur zu einer untergeordneten Immunreaktion.

WO 01/25321 A1

# 1                    3D-MATRIX ZUR HERSTELLUNG VON ZELLTRANSPLANTATEN

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer biologisch ver-  
träglichen dreidimensionalen Matrix, eine mit dem erfindungsgemäßen Ver-  
fahren erhältliche Matrix, sowie deren Verwendung.

Auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin sind in den letzten Jahren er-  
hebliche Erfolge erzielt worden. Probleme bereiten jedoch die geringen ver-  
fügbaren Mengen an Spenderorganen, was zu erheblichen Wartezeiten für  
transplantationspflichtige Patienten geführt hat. Ein weiteres Problem be-  
steht darin, dass mit den Spenderorganen auch Krankheitserreger übertra-  
gen werden können, wie dies zumindest zeitweise bei Spendern der Fall  
war, die an AIDS erkrankt waren. Ferner werden transplantierte Organe  
vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt. Nach erfolgter  
Transplantation ist der Patient daher auf immunsuppressive Medikamente  
zur Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen angewiesen. In jüngerer Zeit  
sind Versuche unternommen worden, künstliche Organe aus Zellkulturen  
zu züchten, wobei in einigen Bereichen beträchtliche Erfolge erzielt werden  
konnten. Dabei werden Zellen auf einer dreidimensionalen Matrix kultu-  
viert, die entsprechend den Bedürfnissen geformt werden kann, beispiels-  
weise in Form eines Ohrs. Dieses künstliche Organ oder Körperteil kann  
dann transplantiert werden, wobei bei Verwendung körpereigener Zellen  
diese nicht als fremd vom Immunsystem des Empfängers erkannt werden,  
also auch keine Abstoßungsreaktion eintreten kann.

Als Material für die Matrix sind beispielsweise Collagen oder Alginat im  
Gemisch mit Chitosan bekannt. Insbesondere Collagen wird jedoch wegen  
der Herstellung aus Rinderknorpel und der damit verbundenen BSE-Gefahr  
nur ungern für die Herstellung von Implantaten für menschliche Patienten  
verwendet.

Als vielversprechendes Matrixmaterial hat Chitosan ein immer größeres In-  
teresse gefunden. Chitosan ist ein teilweise deacetyliertes Chitin und wird  
aus den Exoskeletten von Arthropoden gewonnen. Es ist ein Aminopolysac-  
charid (Poly-1-4-glucosamin), das beispielsweise im Medizinbereich als  
Nahtmaterial oder zur Verkapselung von Pharmaka verwendet wird. Sein  
Vorteil liegt darin, dass es vom Körper vollständig resorbiert werden kann.

1 Chitosan kann im leicht Sauren ( $\text{pH} < 6$ ) durch Protonierung der freien  
Aminogruppen in Wasser gelöst werden. Im Alkalischen ( $\text{pH} > 7$ ) fällt es  
aus der wässrigen Lösung wieder aus. Durch diesen pH-abhängigen Mecha-  
nismus kann Chitosan unter milden Bedingungen gereinigt und verarbeitet  
5 werden.

In der US 5,871,985 wird ein Träger für die Transplantation in einen Pati-  
enten vorgeschlagen, der aus einer Matrix besteht, in die Zellen eingewach-  
sen sind. Dazu wird zunächst eine Lösung aus Chitosan hergestellt, in der  
10 lebende Zellen enthalten sind. Diese Lösung wird dann in eine semipermea-  
ble Membran eingeschlossen, um den Träger auszubilden. Das Chitosan  
wird präzipitiert und bildet eine unvernetzte Matrix aus in der die Zellen  
verteilt sind.

15 Madihally et al. (Biomaterials 1999; 20(12), S. 1133 – 42) beschreibt eine  
Matrix für die Geweberegeneration. Chitosan, das zu 85 – 90 % deacetyliert  
ist wird dazu in 0,2 M Essigsäure gelöst, sodass Lösungen mit einem Ge-  
halt von 1 bis 3 Gew.-% Chitosan erhalten werden. Die Lösung wird einge-  
frozen und das Wasser und die überschüssige Essigsäure durch Lyophil-  
20 sieren entfernt. Durch die Lyophilisationsbedingungen kann dabei die  
Form der sich bildenden Poren beeinflusst werden. Der mittlere Poren-  
durchmesser der erhaltenen Matrix liegt im Bereich von 40 – 250  $\mu\text{m}$ . Die  
frisch lyophilisierte Matrix wird als steif und unelastisch beschrieben.  
Beim Hydratisieren in einem neutralen wässrigen Medium quillt das Chito-  
25 san rasch und löst sich schließlich auf. Ein erneutes Auflösen der Chito-  
sanstruktur kann durch Äquilibrieren in verdünnter NaOH oder durch Wa-  
schen mit einer Ethanolreihe, beispielsweise 100, 70, 50, 0 %, verhindert  
werden. Die lyophilisierte Matrix wird dazu für ca. 10 Minuten in 0,05 M  
NaOH äquilibriert und mit Wasser und PBS (phosphatgepufferte physiologi-  
30 sche Kochsalzlösung) gewaschen. Beim Äquilibrieren in verdünnter NaOH  
schrumpft die Matrix jedoch und zeigt Veränderungen in ihrem Aufbau, die  
bei einer Erniedrigung des pH auf 7 nur zum Teil reversibel sind. Ferner  
zeigt die Matrix zahlreiche Lufteinschlüsse. Bessere Ergebnisse werden bei  
einer Äquilibrierung mit einer Ethanolreihe erhalten. Zur Entfernung von  
35 Lufteinschlüssen wird beim Waschen mit absolutem Alkohol zunächst kurz  
ein Vakuum angelegt. Als weiterer Vorteil wird angeführt, dass durch die  
Behandlung mit Alkohol die Matrix während der Äquilibrierung sterilisiert

1 wird. Dennoch ist das Verfahren vergleichsweise aufwändig. Auch bei einer  
Stabilisierung der Membran durch eine Ethanolreihe findet eine Verände-  
rung der Porenstruktur statt, da durch das Wasser das Chitosan lokal auf-  
gelöst werden kann und damit die Porenstruktur partiell zerstört wird. Die  
5 hydratisierte Matrix wird als weich und flexibel beschrieben, zeigt jedoch  
nur eine geringe Festigkeit. Dies erschwert die Verarbeitung der Matrix er-  
heblich. Wird diese beispielsweise für die Kultivierung von Knorpelzellen  
zur Bildung von Knorpel in die entsprechende Form zugeschnitten, zer-  
bricht die Matrix sehr leicht. Ebenso wird die Kultivierung der Zellen er-  
10 schwert, da die Matrix durch Manipulationen, beispielsweise beim Umbet-  
ten in frisches Kulturmedium, leicht in mehrere Bruchstücke zerfällt. Da-  
mit lassen sich mit bekannten Chitosanmatrices nur sehr schwer Implan-  
tate mit einer definierten Struktur herstellen. Weiter beschreiben Madihally  
et al. die Herstellung von Mikrocarriern. Dazu werden entweder Tropfen der  
15 wässrigen Chitosanlösung direkt beispielsweise in flüssigem Stickstoff ein-  
gefroren oder vor dem Einfrieren im Alkalischen durch NaOH als Gel aus-  
gefällt. Größere Strukturen werden nicht beschrieben.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung  
20 einer biologisch verträglichen, dreidimensionalen Matrix zur Verfügung zu  
stellen, das einen geringeren Aufwand erfordert und zu stabilen, weichen  
Matrices führt.

Die Aufgabe wird gemäß einer ersten Ausführungsform der Erfindung ge-  
25 löst mit einem Verfahren zur Herstellung einer biologisch verträglichen  
dreidimensionalen Matrix, wobei aus Chitosan und einem Überschuss einer  
Säure eine wässrige Lösung hergestellt wird, die wässrige Lösung neutrali-  
siert wird, die neutralisierte wässrige Lösung eingefroren wird und das  
Wasser unter vermindertem Druck absublimiert wird.

30 Eine dreidimensionale Matrix mit vergleichbaren Eigenschaften wird gemäß  
einer zweiten Ausführungsform der Erfindung erhalten mit einem Verfah-  
ren zur Herstellung einer biologisch verträglichen dreidimensionalen Ma-  
trix, wobei aus Chitosan und einem Überschuss einer Säure, die ausge-  
35 wählt ist aus der Gruppe, die gebildet ist von Alkyl- und Arylhydroxycar-  
bonsäuren, eine wässrige Lösung hergestellt wird, die wässrige Lösung ein-  
gefroren wird und das Wasser unter vermindertem Druck absublimiert

1 wird, wobei überschüssige Säure vor oder nach dem Absublimieren entfernt wird.

5 Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird zunächst eine wässrige Lösung eines teilweise deacetylierten Chitosans und einer im Überschuss vorliegenden Säure hergestellt. Unter Überschuss wird dabei verstanden, dass der pH der wässrigen Lösung im Sauren liegt, vorzugsweise unterhalb von  $\text{pH} \leq 4$ . Dadurch sind die freien Aminogruppen des Chitosans zumindest teilweise protoniert, wodurch die Löslichkeit in Wasser gesteigert wird. Die  
10 Säuremenge ist nicht kritisch. Sie muss lediglich so gewählt sein, dass das Chitosan in Lösung geht. Eine übermäßige Säurezugabe wird nach Möglichkeit vermieden, da überschüssige Säure wieder entfernt werden muss, und dadurch die Aufarbeitung bei großen Säuremengen erschwert wird. Günstig sind Säuremengen, die eine 0,05 bis 1 N, vorzugsweise 0,1 bis  
15 0,5 N, insbesondere 0,1 bis 0,3 N Lösung ergeben.

Als Säure besonders geeignet ist Milchsäure. Die fertiggestellte Matrix enthält dann Lactationen als Gegenionen des Chitosans. Die Matrix ist in diesem Fall besonders weich und elastisch.

20 Die Chitosanmenge wird vorzugsweise so gewählt, dass sich eine Konzentration von 0,01 bis 5 Gewichts-%, vorzugsweise 0,5 bis 1 Gewichts-% ergibt. Durch die Konzentration der Chitosanlösung kann Einfluss auf die Struktur der Matrix, insbesondere deren Porengröße genommen werden.  
25 Auf diese Weise lässt sich die Porengröße der Matrix auf den jeweiligen Zelltypus abstimmen, mit dem die Matrix besiedelt werden soll.

Chitosan hat wegen seiner Herstellung aus natürlichen Quellen kein einheitliches Molekulargewicht. Je nach Quelle und Aufbereitungsverfahren  
30 kann das Molekulargewicht zwischen 20 kDa bis über 1.000 kDa betragen. Für die Herstellung der dreidimensionalen Matrix ist das Chitosan hinsichtlich seines Molekulargewichts keinen Beschränkungen unterworfen.

35 Nach dem Einfrieren wird das Wasser unter vermindertem Druck absublimiert. Geeignete Druckbereiche sind 0,001 bis 3 hPa. Die genauen Bedingungen werden von der Zusammensetzung der wässrigen Lösung beeinflusst. Sofern eine flüchtige Säure verwendet wurde, kann diese beim Lyo-

1     philisieren zumindest teilweise mit verdampft werden.

Bevorzugt wird vor dem Einfrieren zur Entfernung überschüssiger Säure durch Zugabe einer Base der pH-Wert der wässrigen Lösung auf 5,0 bis  
5     7,5, vorzugsweise 5,5 bis 7,0, insbesondere 6,0 bis 7,0 eingestellt. Es wird eine Matrix mit sehr guten Eigenschaften hinsichtlich ihrer Formstabilität erhalten. Die Matrix schrumpft beim Rehydratisieren nicht und zeigt auch keine Strukturveränderungen. Besonders ausgeprägt ist dieses stabile Verhalten, wenn die wässrige Lösung vor dem Einfrieren einen pH von 6,0 bis  
10    7,0 aufweist. In diesem Bereich beginnt das Chitosan auszufallen. Es wird angenommen, dass sich im Neutralen ein Gel oder eine feine Suspension ausbildet, die sich positiv auf die Struktur der lyophilisierten Matrix auswirkt. Die neutralisierte wässrige Lösung des Chitosans bildet also eine Suspension. Je nach Konzentration des Chitosans kann die wässrige Lö-  
15    sung beim Neutralisieren daher trüb werden.

Bei einem Verfahren, wie es von Madhally et al. vorgeschlagen wurde, erfährt die Matrix bei der Neutralisation überschüssiger Essigsäure durch Äquilibrieren mit wässriger NaOH eine starke Veränderung der Struktur.  
20    Vermutlich führt die Zugabe der wässrigen Lösung lokal zur Auflösung des Chitosans, wobei dieses durch die NaOH wieder ausgefällt wird. Damit wird die Porenstruktur der Matrix verändert.

Mit dem von den Erfindern aufgefundenen Verfahren ist nun eine Möglichkeit aufgefunden worden, die Matrix zu stabilisieren, sodass nach der Entfernung des Wassers durch Lyophilisieren keine bzw. wesentlich geringere Strukturänderungen bei der weiteren Verarbeitung der Matrix auftreten.  
25

Bei der ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist  
30    die Chitosanlösung bereits vor dem Einfrieren und Lyophilisieren einen neutralen pH auf. Als "neutraler pH" ist dabei ein pH im oben angegebenen Bereich zu verstehen. Nach dem Lyophilisieren muss daher die Matrix auch nicht mehr mit Base äquilibriert werden. Wesentlich ist, dass die Chitosanlösung ausreichend neutralisiert wird und das Chitosan als Gel ausfällt.  
35    Wird die Neutralisation nicht sorgfältig ausgeführt, löst sich die erhaltene Matrix beim Rehydratisieren wieder auf. Bei der ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Säure zunächst keinen besonde-

1      ren Beschränkungen unterworfen.

Für die Herstellung der wässrigen Chitosanlösung kann eine Säure verwendet werden, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet ist von anorganischen Säuren und organischen Säuren, vorzugsweise Alkyl- und Arylcarbonsäuren, insbesondere Hydroxycarbonsäuren. Besonders bevorzugt ist Milchsäure.

10      Beispiele für anorganische Säuren sind Salzsäure, Phosphorsäure und saure Phosphatsalze. Beispiele für organische Säuren sind Alkylcarbonsäuren mit 1 bis 12 Kohlenstoffatomen, wobei die Alkylkette geradkettig oder verzweigt sein kann. Beispiele sind Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Hexansäure, Heptansäure und höhere geradkettige Carbonsäuren. Geeignet sind auch Dicarbonsäuren mit 2 bis 8 Kohlenstoffatomen, wie Oxalsäure, Bernsteinsäure oder Adipinsäure. Geeignet sind auch aromatische Carbonsäuren, wie Benzoesäure oder Naphthoesäuren. Ferner sind auch Aminosäuren, wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure, geeignet.

20      Besonders gute Ergebnisse werden jedoch mit Hydroxycarbonsäuren erhalten. Geeignet sind insbesondere Hydroxycarbonsäuren mit 2 bis 12 Kohlenstoffatomen. Es können ein oder mehrere Hydroxylgruppen sowie ein oder mehrere Carboxylgruppen im Molekül vorhanden sein. Beispiele sind Glycolsäure, Milchsäure, Äpfelsäure, Weinsäure, sowie Zitronensäure. Es können auch aromatische Hydroxycarbonsäuren verwendet werden, beispielsweise Mandelsäure.

30      Als Basen können übliche Basen, wie z. B. Alkalihydroxide, wie NaOH, verwendet werden. Die Basen sollten so gewählt werden, dass ohne Weiteres ein neutraler pH eingestellt werden kann.

Eine weitere Möglichkeit, eine Matrix mit verbesserter Struktur zu erhalten, besteht darin, die Matrix bereits durch die zum Auflösen des Chitosans in Wasser verwendete Säure zu stabilisieren.

35      Überraschend hat sich gezeigt, dass durch die Wahl des Gegenions die Eigenschaften der Chitosanmatrix beeinflusst werden können. Dies wird bei der zweiten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens genutzt.

1 Als Säuren werden dabei Hydroxycarbonsäuren verwendet. Insbesondere  
bei Verwendung von Milchsäure, bei dem das Lactatanion das Gegenion zur  
protonierten Aminogruppe des Chitosans bildet, werden sehr gute Eigen-  
schaften erhalten. Die Matrix zeigt eine hohe Temperaturbeständigkeit und  
5 kann beispielsweise problemlos autoklaviert werden. Dabei treten keine  
Verfärbungen oder sonstige Zersetzungerscheinungen der Matrix auf. Die  
Matrix zeigt auch eine hohe Elastizität und mechanische Belastbarkeit. So  
lässt sich eine flächige Matrix, die durch Ausgießen der wässrigen Chito-  
san/Milchsäurelösung in einer Petrischale und anschließendem Einfrieren  
10 und Lyophilisieren erhalten wird, problemlos aufrollen, ohne dass die Ma-  
trix bricht.

Bei der zweiten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens tritt  
der stabilisierende Effekt der Hydroxyalkyl- bzw. -arylcabonsäuren bereits  
15 auf, wenn die Chitosanlösung vor dem Einfrieren nicht neutralisiert wird.  
Nach dem Lyophilisieren werden noch vorhandene Reste überschüssiger  
Säure durch Äquilibrieren mit Base, z. B. 0,05 N NaOH, entfernt. Anschlie-  
ßend wird die Matrix noch mit Wasser, das einen Phosphatpuffer enthalten  
kann (0,1 N, pH ca. 7) gewaschen. Die Strukturveränderungen der Matrix  
20 fallen dabei erheblich geringer aus als bei der von Madhally beschriebenen  
Matrix. Besonders vorteilhaft wird bei der zweiten Ausführungsform des er-  
findungsgemäßen Verfahrens die Chitosanlösung bereits vor dem Einfrie-  
ren neutralisiert. Ein Äquilibrieren im Alkalischen ist dann nicht mehr er-  
forderlich. Die Matrix kann direkt weiterverarbeitet und beispielsweise mit  
25 Zellen besiedelt werden.

Mit beiden Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird  
eine Matrix mit einer gleichmäßigen Porenstruktur erhalten, die weich und  
nachgiebig ist. Wird die Matrix beispielsweise mit Fingerdruck zusammen-  
30 gepresst, kehrt sie nach Aufheben des Drucks wieder elastisch in ihre ur-  
sprüngliche Form zurück. Die Matrix lässt sich verformen ohne zu brechen  
oder zu zerbröseln und lässt sich beispielsweise aufrollen.

Zur Ausbildung von zusammenhängenden Zellverbänden ist es erforderlich,  
35 dass die Matrix während der Besiedelung durch Zellen eine ausreichende  
Beständigkeit aufweist und erst über einen längeren Zeitraum abgebaut  
wird. Die Abbaugeschwindigkeit kann über den Deacetylierungsgrad des



- 1 Chitosans gesteuert werden. Bei Verwendung eines Chitosans, das noch einen sehr hohen Acetylierungsgrad aufweist, lassen sich Abbauzeiten von mehr als einem Monat verwirklichen.
- 5 Eine besonders hohe Resorbierbarkeit der Matrix wird beobachtet, wenn das Chitosan einen Deacetylierungsgrad von  $\leq 80$  % aufweist. Der Deacetylierungsgrad bezieht sich auf die N-Acetylgruppen des Chitosans. Unter Deacetylierungsgrad wird das Verhältnis der nicht acetylierten Aminogruppen zu den insgesamt vorhandenen Aminogruppen verstanden (Summe aus
- 10 freien Aminogruppen und acetylierten Aminogruppen). Es wird angenommen, dass bei einem Deacetylierungsgrad von  $\leq 80$  % in weiten Bereichen der Matrix amorphe Strukturen ausgebildet werden. Diese amorphen Bereiche können vermutlich von Enzymen besser angegriffen werden. Damit kann die Geschwindigkeit, mit der die Matrix im Körper resorbiert wird, beeinflusst und auf die jeweiligen Bedürfnisse abgestimmt werden.
- 15

Die Porengröße der Matrix kann weiter durch die Geschwindigkeit beeinflusst werden, mit der die wässrige Chitosanlösung eingefroren wird. Dabei ergibt ein rasches Einfrieren, beispielsweise in flüssigem Stickstoff kleine

20 Porendurchmesser, während langsames Einfrieren, beispielsweise im Bereich von  $-30$  bis  $-15$  °C größere Poren ergibt. Bevorzugt wird die Temperatur zum Einfrieren der Chitosanlösung im Bereich von  $-200$  °C bis  $-0$  °C, vorzugsweise  $-90$  °C bis  $-10$  °C, insbesondere bevorzugt  $-40$  °C bis  $-15$  °C gewählt.

25 Die mit dem oben beschriebenen Verfahren erhältliche Matrix weist hervorragende Eigenschaften gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Matrices auf. Gegenstand der Erfindung ist daher auch eine Matrix, wie sie mit dem oben beschriebenen Verfahren erhalten wird. Die Matrix ist

30 formstabil, weich und flexibel und kann dadurch leicht verarbeitet und beispielsweise einfach in die gewünschte Form zugeschnitten werden. Sie kann autoklaviert und dadurch einfach sterilisiert werden, ohne das Zersetzungsreaktionen auftreten. Zur Stabilisierung der Matrix sind keine weiteren Substanzen, wie Collagen oder Alginat erforderlich. Der Acetylierungsgrad und damit beispielsweise die Resorbierbarkeit der Matrix ist frei

35 wählbar und damit auf die jeweiligen Erfordernisse einstellbar. Durch die Konzentration der wässrigen Chitosanlösung und die Einfrierbedingungen

- 1 kann die Struktur der Matrix, insbesondere die Porengröße beeinflusst werden.

- 5 Eine sehr formstabile und flexible Matrix wird erhalten, wenn die Matrix ein Lactat-Anion als Gegenion aufweist.

- Durch die große Anzahl von Aminogruppen ist die Matrix beliebig modifizierbar. Bei einer bevorzugten Ausführungsform der dreidimensionalen Matrix sind Liganden kovalent oder nicht kovalent an die Chitosanmatrix gebunden, vorzugsweise an die freien Aminogruppen des Chitosans. Als Li-  
10 ganden können z. B. Wachstumsstoffe, Proteine, Hormone, Heparin, Heparansulfate, Chondroitinsulfate, Dextransulfate oder eine Mischung dieser Substanzen verwendet werden. Die Liganden dienen vorzugsweise zur Kontrolle und Verbesserung der Zellproliferation.

- 15 Das Zellwachstum auf der Matrix wird weiter verbessert, wenn die Matrix mit autologem Fibrin beschichtet ist.

- 20 Die erfindungsgemäße dreidimensionale Matrix kann als Festphase in einem Kulturreaktor (Cell Factory) verwendet werden. Die Matrix zeigt eine sehr hohe Beständigkeit im Kulturmedium. Ferner hat sich gezeigt, dass die Matrix das Zellwachstum fördert.

- 25 Die Matrix regt das Zellwachstum an. Sie kann daher direkt, d. h. ohne vorherige Besiedlung durch Zellen implantiert werden. Nach der Implantierung wachsen körpereigene Zellen ein, wobei die Matrix allmählich aufgelöst wird.

- Die Matrix eignet sich ferner zur Verwendung als Zellimplantat, insbesondere für knorpelbildende Zellen. Es werden dabei bevorzugt keine gentechnisch veränderten Zellen verwendet. Die Zellen werden vorzugsweise durch Biopsie dem Patienten entnommen, auf der Zellmatrix angezüchtet und das Zellimplantat dann dem Patienten eingepflanzt. Durch die Besiedlung der dreidimensionalen Matrix mit körpereigenen Stammzellen (Knochenersatz),  
30 die sich - angeregt durch die jeweiligen Wachstumsfaktoren des umliegenden Gewebes - erst am Ort des Transplantats differenzieren oder durch Besiedlung mit Knorpelzellen zur erneuten Bildung hyalinen Knorpels sind Abstoßungsreaktionen des Transplantats weitgehend ausgeschlossen. Dies  
35

1 ist ein großer Vorteil gegenüber bisherigen Matrices aus verschiedenen  
Kunststoffen oder Keramiken. Diese Materialien verbleiben im Körper und  
können noch nach Jahren als fremd erkannt und abgestoßen werden. Die  
dreidimensionale Matrix kann sowohl mit humanen als auch mit animali-  
5 schen Zellen (beispielsweise vom Pferd, Hund oder Hai) besiedelt werden.  
Besonders geeignet sind Haizellen, da diese beim Empfänger keine wesent-  
liche immunologische Antwort auslösen. Haizellen werden bereits als Or-  
ganersatz verwendet, z. B. für Augenlinsen.

10 Ein erfindungsgemäßes Implantat, das nur eine geringe bis überhaupt kei-  
ne Immunantwort stimuliert, ist vorteilhaft aus der oben beschriebenen  
dreidimensionalen Matrix aufgebaut, die vorzugsweise mit körpereigenen  
Zellen besiedelt ist. So kann beispielsweise eine dünne, flächige Matrix, die  
in einem geeigneten Kulturmedium steril mit Keratocyten besiedelt wurde,  
15 als Hauttransplantat dienen. Die besiedelte Matrix kann im Operationssaal  
steril aus dem Kulturmedium entnommen werden und auf die gereinigte  
Wundfläche aufgebracht werden. In die Matrix können dann körpereigene  
Zellen unter Ausbildung von Gewebe einwandern.

20 Möglich ist auch eine Ausführungsform als künstliche Leber. Die Matrix  
wird dabei in einem geeigneten Kulturmedium mit Leberzellen besiedelt.  
Der Zellverbund, der noch durch die Matrix stabilisiert sein kann, wird  
dann in den Körper eines Patienten eingepflanzt und kann dort  
beispielsweise eine geschädigte Leber in ihrer Funktion unterstützen.

25 Erfolge wurden erreicht, wenn die dreidimensionale Matrix mit autologen  
Chondrozyten besiedelt ist. Die Matrix kann dann an den entsprechenden  
Stellen auf den Knorpel transplantiert werden, wo sich dann neue Knorpel-  
substanz entwickeln kann. Dies bietet große Vorteile gegenüber der derzeit  
üblichen Methode der Transplantation von Knorpelzellen ohne Trägerma-  
30 trix. Die bei diesem Verfahren bestehende hohe Wahrscheinlichkeit einer  
Verletzung der Knochenhaut und nachfolgendem Einwachsen von Knochen-  
zellen in die neue Knorpelschicht mit folgender Degenerierung des neuen  
Knorpels wird durch das erfindungsgemäße Implantat vermieden.

35 Beispiele für weitere Zellen, die geeignet für eine Besiedlung der Matrix  
sind, sind Osteocyten, Keratinocyten, Hepatozyten, Knochenmarksstamm-

1 zellen oder neuronale Zellen.

Die Erfindung wird im Weiteren unter Bezugnahme auf mehrere Figuren  
und anhand von Beispielen genauer erläutert. Die Figuren zeigen im Ein-  
5 zeln:

**Fig. 1** eine Abbildung einer Matrix mit Lactat als Gegenion, wobei bei  
der Herstellung der Matrix die wässrige Chitosanlösung vor dem Einfrieren  
neutralisiert wurde;

10

**Fig. 2** eine Abbildung einer Matrix, wobei bei der Herstellung der Ma-  
trix die Matrix nach dem Lyophilisieren mit NaOH (5 Gew.-%) äquilibriert  
wurde; das Gegenion wird bei (a) durch Lactat und bei (b) durch Phosphat  
gebildet;

15

**Fig. 3** eine mikroskopische Aufnahme einer mit Chondrozyten be-  
siedelten Matrix.

**Beispiel 1:** Allgemeine Herstellvorschrift zur Herstellung einer dreidimen-  
sionalen Matrix (1. Ausführungsform)

20

Chitosan wird in verdünnter wässriger Säure bei einem pH zwischen 3 und  
6 unter Rühren gelöst. Anschließend wird mit verdünnter NaOH der ge-  
wünschte pH-Wert eingestellt. Die Lösung wird in ein geeignet geformtes  
25 Gefäß überführt und bei -30 bis -15°C eingefroren. Das Gefäß mit der ge-  
frorenen Lösung wird in einen Lyophilisator überführt und das Wasser un-  
ter vermindertem Druck (0,01 bis 0,5 hPa) absublimiert. Der schwammarti-  
ge Rückstand kann ohne weitere Reinigung für die Besiedlung mit Zellen  
eingesetzt werden.

30

**Beispiel 2:** Allgemeine Herstellvorschrift zur Herstellung einer dreidimen-  
sionalen Matrix (2. Ausführungsform)

35

Chitosan wird in verdünnter wässriger Hydroxycarbonsäure bei einem pH  
zwischen 3 und 6 unter Rühren gelöst. Die klare Lösung wird bei einer  
Temperatur von -30 bis -15°C in einem geeignet geformten Gefäß eingefro-  
ren. Das Gefäß mit der gefrorenen Lösung wird in einen Lyophilisator über-

- 1 führt und das Wasser unter vermindertem Druck (0,01 bis 0,5 hPa) absublimiert. Der nach dem Absublimieren des Wassers zurückbleibende schwammartige Rückstand wird für 24 Stunden in Natronlauge (5 Gew.-%) alkalisiert. Anschließend wird die schwammartige Matrix mit entionisiertem Wasser gewaschen bis auf einen für Zellen verträglichen pH-Wert.
- 5

**Beispiel 3:** Herstellung einer porösen Chitosanmatrix (Gegenion: Lactat)

- 0,1 g Chitosan und 0,1113 g Milchsäure (90 % in Wasser, bezogen von Merck KGaA, Darmstadt) wurden in 9,79 g entionisiertem Wasser unter Rühren gelöst und der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf 7 eingestellt. Die klare Lösung wurde zunächst bei -24 °C eingefroren und anschließend bei einem Druck von 0,05 hPa das Lösungsmittel absublimiert.
- 10

- 15 Erhalten wurde ein weißer feinporiger Schaum, der eine schwammartige Elastizität aufwies. Der Schaum wurde ohne weitere Reinigung für die Besiedelung mit Zellen verwendet. Die Matrix ist in Fig. 1 abgebildet. Sie weist eine gleichmäßige, fein strukturierte Oberfläche auf. Es sind keine Verwerfungen festzustellen, die Matrix zeigt durchgehend eine gleichmäßige feinporige Struktur.
- 20

**Beispiel 4:** Herstellung einer poröser Chitosanmatrix (Gegenion: Acetat) (1. Ausführungsform)

- 25 0,1 g Chitosan und 0,1 g Eisessig (100 %ig) wurden in 9,79 g entionisiertem Wasser unter Rühren gelöst und der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf 7 eingestellt. Die klare Lösung wurde zunächst bei -24 °C eingefroren und anschließend bei einem Druck von 0,05 hPa das Lösungsmittel absublimiert.
- 30 Erhalten wurde ein weißer feinporiger Schaum.

**Beispiel 5:** Herstellung einer porösen Chitosanmatrix (Gegenion: Phosphat)

- 0,1 g Chitosan und 0,037 ml ortho-Phosphorsäure (85 % Sigma P 6560) wurden in 7,00 g entionisiertem Wasser unter Rühren gelöst und der pH-Wert mit 1 M Natronlauge auf 7 eingestellt. Die klare Lösung wurde zunächst bei -24 °C eingefroren und anschließend bei einem Druck von
- 35

- 1 0,05 hPa das Lösungsmittel absublimiert.

Erhalten wurde ein weißer feinporiger Schaum, der eine schwammartige Elastizität aufwies. Der Schaum wurde ohne weitere Reinigung für die Be-  
5 siedelung mit Zellen verwendet.

**Beispiel 6:** Herstellung einer porösen Chitosanmatrix (Gegenion: Glutamat)

0,1 g Chitosan und 0,1 g Glutaminsäure (Sigma G 6904) wurden in 10,00 g  
10 entionisiertem Wasser unter Rühren gelöst und der pH-Wert mit 1 M Na-  
tronlauge auf 7 eingestellt. Die klare Lösung wurde zunächst bei -24 °C  
eingefroren und anschließend bei einem Druck von 0,05 hPa das Lösungs-  
mittel absublimiert.

15 Erhalten wurde ein weißer feinporiger Schaum, der eine schwammartige  
Elastizität aufwies.

**Beispiel 7:**

0,1 g Chitosan und 0,1113 g Milchsäure wurden in 9,79 g entionisiertem  
20 Wasser unter Rühren gelöst und die klare Lösung zunächst bei -24 °C ein-  
gefroren. Anschließend wurde bei einem Druck von 0,05 hPa das Lösungs-  
mittel absublimiert. Der schwammartige Rückstand wurde für 24 Stunden  
in Natronlauge (5 Gew.-%) alkalisiert und anschließend mit entionisiertem  
Wasser neutral gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein elastischer weis-  
25 ser Schaum erhalten. Die Matrix ist in Fig. 2a abgebildet.

**Vergleichsbeispiel 1:**

0,1 g Chitosan und 0,037 ml ortho-Phosphorsäure wurden in 7,00 g entio-  
nisiertem Wasser unter Rühren gelöst und die klare Lösung zunächst bei  
30 -24 °C eingefroren. Anschließend wurde bei einem Druck von 0,05 hPa das  
Lösungsmittel absublimiert. Der schwammartige Rückstand wurde für 24  
Stunden in Natronlauge alkalisiert und anschließend mit entionisiertem  
Wasser neutral gewaschen. Nach dem Trocknen wurde ein brüchiger weis-  
ser Schaum erhalten. Die Matrix ist in Fig. 2b abgebildet.

35

**Beispiel 8:** Herstellung einer porösen Chitosanmatrix mit anionischem Cha-  
rakter (Immobilisierung von L-Glutaminsäure)

1 0,1 g Chitosan wurden in 10 ml Wasser gegeben und der pH mit 1 M Salz-  
säure auf 4 eingestellt und die Mischung wurde für 24 Stunden gerührt.  
Durch Zugabe von 1 N NaOH wurde der pH auf 5,8 eingestellt und dann  
5 unter Rühren 0,05 g Glutaminsäure und 0,05 g 1-Ethyl-3-(3-Dimethyla-  
minopropyl) Carbodiimid (EDAC) zugegeben und gelöst. Nachdem für weite-  
re 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt worden war, wurde, der pH mit  
1 M NaOH auf 7 eingestellt, der Niederschlag abfiltriert und mit 2 l entioni-  
siertem Wasser gewaschen. Der gewaschene Niederschlag wurde mit  
10 0,1113 g Milchsäure (90 % in Wasser, bezogen von Merck KGaA, Darm-  
stadt) in 9,79 g Wasser unter Rühren gelöst. Der pH wurde mit 1 N Natron-  
lauge auf 7 eingestellt und die Lösung bei -24 °C eingefroren. Anschließend  
wurde das Wasser bei einem Druck von 0,05 hPa absublimiert.

Es wurde ein weißer schwammartiger Rückstand erhalten. Der Schwamm  
15 kann ohne weitere Reinigung verwendet werden.

**Beispiel 9:** Herstellung einer dreidimensionalen Matrix mit immobilisierten  
Zelladhäsionsfaktoren L-Arg-L-Gly-L-Asp

20 0,1 g Chitosan wurden in 10 ml Wasser gegeben und der pH mit 1 M Salz-  
säure auf 4 eingestellt. Nachdem 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt  
wurde, wurde der pH der klaren Lösung mit 1 M NaOH auf 5,8 eingestellt  
und anschließend nacheinander 0,01 g L-Arg-L-Gly-L-Asp und 0,05 g 1-E-  
thyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimid (EDAC) zugegeben und unter  
25 Rühren gelöst. Nachdem für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur ge-  
rührt worden war, wurde der pH mit 1 N NaOH auf 7 eingestellt. Der Nie-  
derschlag wurde abfiltriert und mit 2 l Wasser gewaschen. Anschließend  
wurde der Niederschlag mit 0,1113 g Milchsäure (90 % in Wasser, bezogen  
von Merck KGaA, Darmstadt) in 9,79 g Wasser unter Rühren gelöst, der pH  
30 mit 1 N Natronlauge auf 7 eingestellt und die Lösung bei -24 °C eingefro-  
ren. Schließlich wurde das Wasser bei einem Druck von 0,05 hPa absubli-  
miert.

Es wurde ein weißer schwammartiger Rückstand erhalten. Der Schwamm  
35 kann ohne weitere Reinigung verwendet werden.

- 1 **Beispiel 10:** Allgemeine Arbeitsvorschrift für die Aussaat und Inkubation von Zellen auf der dreidimensionalen Matrix.

5 Eine gemäß den Beispielen 1 bis 6 erhaltene dreidimensionale Matrix wird in PBS bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Matrix ist anschließend steril und vollständig mit Flüssigkeit benetzt. Anschließend werden Zellen, die in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert wurden, direkt auf eine den Bedürfnissen entsprechend zugeschnittene Matrix gegeben und bei der geeigneten Temperatur inkubiert. Die bewachsene Matrix kann steril ent-  
10 nommen und beispielsweise implantiert werden.

**Beispiel 11:** Kultivierung von Chondrozyten auf der dreidimensionalen Matrix.

- 15 Autologe Chondrozyten, die durch Biopsie gewonnen wurden, wurden auf Chondrozyte Growth Medium (CellApplications Inc., USA) kultiviert.

Eine nach Beispiel 3 hergestellte dreidimensionale Matrix wurde zunächst bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die vollständig benetzte Matrix  
20 wurde unter sterilen Bedingungen entsprechend zugeschnitten und in ein Kulturgefäß gegeben. Anschließend wurden die kultivierten Chondrozyten mit dem Kulturmedium auf die dreidimensionale Matrix gegeben und für 14 bis 21 Tage bei 37 °C inkubiert. Innerhalb dieses Zeitraums wuchsen die Zellen in die dreidimensionale Matrix ein. Die bewachsene Matrix wurde  
25 steril entnommen und kann anschließend implantiert werden.

In Fig. 3 ist die besiedelte Chitosanmatrix als mikroskopisch vergrößerte Aufnahme gezeigt. Die durch einen Pfeil gekennzeichneten dunkleren Bereiche aus kugelförmigen Aggregaten sind Zellaggregate, die sich während  
30 der Kultivierung auf der Matrix entwickelt haben. Die Zellen wachsen in die Poren der Matrix hinein und bilden dort dreidimensionale Zellaggregate aus.

Die Eigenschaften der Chitosanmatrix werden stark vom Herstellverfahren  
35 sowie vom verwendeten Gegenion beeinflusst. Der Einfluss des Gegenions wird aus einem Vergleich der Fig. 2a (Beispiel 7) und 2b (Vergleichsbeispiel 1) deutlich. Beide Matrices wurden hergestellt, indem Chitosan und die



1 entsprechende Säure in Wasser gelöst wurden, die Lösung eingefroren und  
das Lösungsmittel absublimiert wurde. Anschließend wurden die  
schaumartigen Rückstände in wässriger NaOH äquilibriert. Bei Verwen-  
5 dung von Lactat als Gegenion (Fig. 2a) fällt die Strukturveränderung der  
Matrix beim Äquilibrieren mit NaOH deutlich geringer aus als bei Verwen-  
dung von Phosphat (Fig. 2b). Die Oberfläche der Matrix ist glatter und zeigt  
eine geringer ausgeprägte Strukturierung. Die in Beispiel 7 erhaltene Ma-  
trix ist deutlich elastischer und stabiler als die Matrix aus dem Vergleichs-  
beispiel 1. Sie lässt sich zusammendrücken und kehrt bei nachlassendem  
10 Druck wieder elastisch in die ursprüngliche Form zurück. Ebenso lässt sie  
sich elastisch verbiegen, ohne dabei zu zerbrechen.

Der Einfluss des Herstellungsverfahrens wird durch Vergleich der Fig. 1  
und 2a deutlich. Bei Fig. 1 (Beispiel 3) erfolgt die Neutralisierung der  
15 Milchsäure vor dem Lyophilisieren, während bei der Matrix aus Fig. 2a die  
Milchsäure nach dem Lyophilisieren durch Alkalisieren mit wässriger  
NaOH entfernt wurde. In Fig. 1 ist deutlich die gleichmäßige Struktur der  
Oberfläche der Matrix zu sehen, die nahezu frei von größeren Vertiefungen  
ist. Die in Fig. 1 dargestellte Matrix zeigt gegenüber der Matrix aus Fig. 2a  
20 eine weiter verbesserte Weichheit und Elastizität.

Die Eigenschaften der Matrices sind in einem qualitativen Vergleich in Ta-  
belle 1 zusammengefasst.

25

30

35

1

**Tabelle 1**

Vergleich der Eigenschaften poröser dreidimensionaler Chitosanmatrices

5		Gegenion	Herstellungsverfahren*	Farbe der Matrix
	Beispiel 3	Lactat	A	weiß
	Beispiel 4	Acetat	A	weiß
	Beispiel 5	Phosphat	A	weiß
	Beispiel 6	Glutaminsäure	A	weiß
10	Beispiel 7	Lactat	B	weiß
	Vergleichsbeispiel 1	Phosphat	B	weiß

15		Flexibilität der Matrix		Verhalten bei Wasserzugabe		Sterilisierung (20 min bei 120 °C)	
	Beispiel 3	weich, flexibel rollbar	+++	stabil, kaum Herauslösen von Partikeln	+++	weiß, keine Veränderung	+++
20	Beispiel 4	weich, flexibel, bricht bei stärkerer Belastung	+	Herauslösen von Fasern und Partikeln	+	leichte Braunfärbung an den Rändern	+
	Beispiel 5	weich, flexibel	++	Herauslösen von Partikeln	+	weiß, keine Veränderung	+++
	Beispiel 6	weich, flexibel	++	Herauslösen von Partikeln	+	weiß, keine Veränderung	+++
25	Beispiel 7	elastisch, biegsam	++	kaum Herauslösen von Partikeln	++	leichte Braunfärbung	+
	Vergleichsbeispiel 1	spröde, bricht leicht	-	starkes Herauslösen von Partikeln	-	deutliche Braunfärbung	-

30

- \*A
- Auflösen des Chitosans bei saurem pH
  - Neutralisieren der wässrigen Lösung
  - Einfrieren
  - Absublimieren des Wassers

35

- B:
- Auflösen des Chitosans bei saurem pH
  - Einfrieren
  - Absublimieren des Wassers
  - Äquilibrieren mit NaOH

1

**P a t e n t a n s p r ü c h e**

1. Verfahren zur Herstellung einer biologisch verträglichen dreidimensionalen Matrix, wobei  
5 aus Chitosan und einem Überschuss einer Säure eine wässrige Lösung hergestellt wird, die wässrige Lösung neutralisiert wird, die neutralisierte wässrige Lösung eingefroren wird und das Wasser unter vermindertem Druck absublimiert wird.
- 10 2. Verfahren zur Herstellung einer biologisch verträglichen dreidimensionalen Matrix, wobei  
aus Chitosan und einem Überschuss einer Säure, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet ist von Alkyl- und Arylhydroxycarbonsäuren, eine wässrige Lösung hergestellt wird,  
15 die wässrige Lösung eingefroren wird und das Wasser unter vermindertem Druck absublimiert wird, wobei überschüssige Säure vor oder nach dem Absublimieren entfernt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Säure Milchsäure ist.  
20
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Entfernung oder Neutralisation der Säure der pH-Wert der wässrigen Lösung durch Zugabe einer Base auf 5,0 bis 7,5, vorzugsweise 5, 5 bis 7,0, insbesondere 6,0 bis 7,0 eingestellt wird.  
25
5. Dreidimensionale Matrix, erhältlich durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4.
6. Dreidimensionale Matrix nach Anspruch 5, wobei Adhäsionsfaktoren,  
30 Hormone und/oder Wachstumsfaktoren an das Chitosangerüst gebunden sind.
7. Dreidimensionale Matrix nach Anspruch 5, wobei die Matrix mit autologem Fibrin beschichtet ist.  
35
8. Verwendung der dreidimensionalen Matrix gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 als Festphase in einem Kulturreaktor.

1     **9.**     Verwendung der dreidimensionalen Matrix gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7 als Matrix für Implantate.

5     **10.**    Implantat, umfassend eine dreidimensionale Matrix gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7.

10

15

20

25

30

35

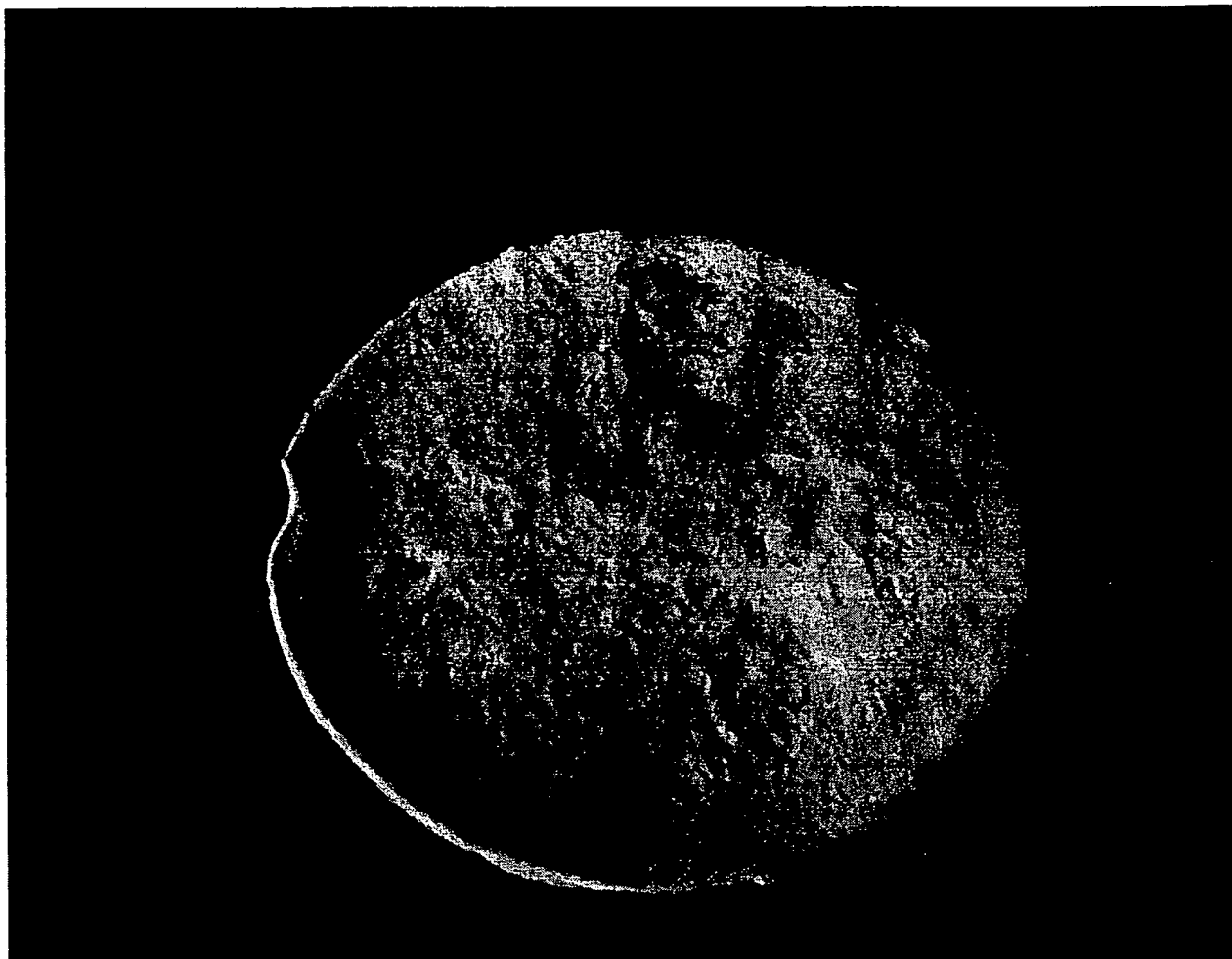


Fig. 1

BEST AVAILABLE COPY

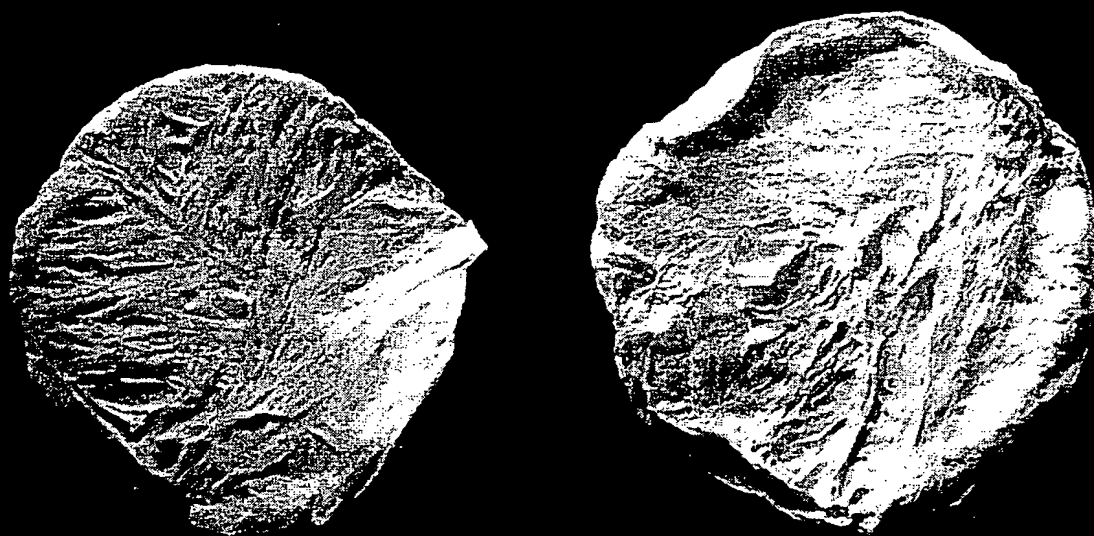


Fig. 2a

Fig. 2b

BEST AVAILABLE COPY

3/3

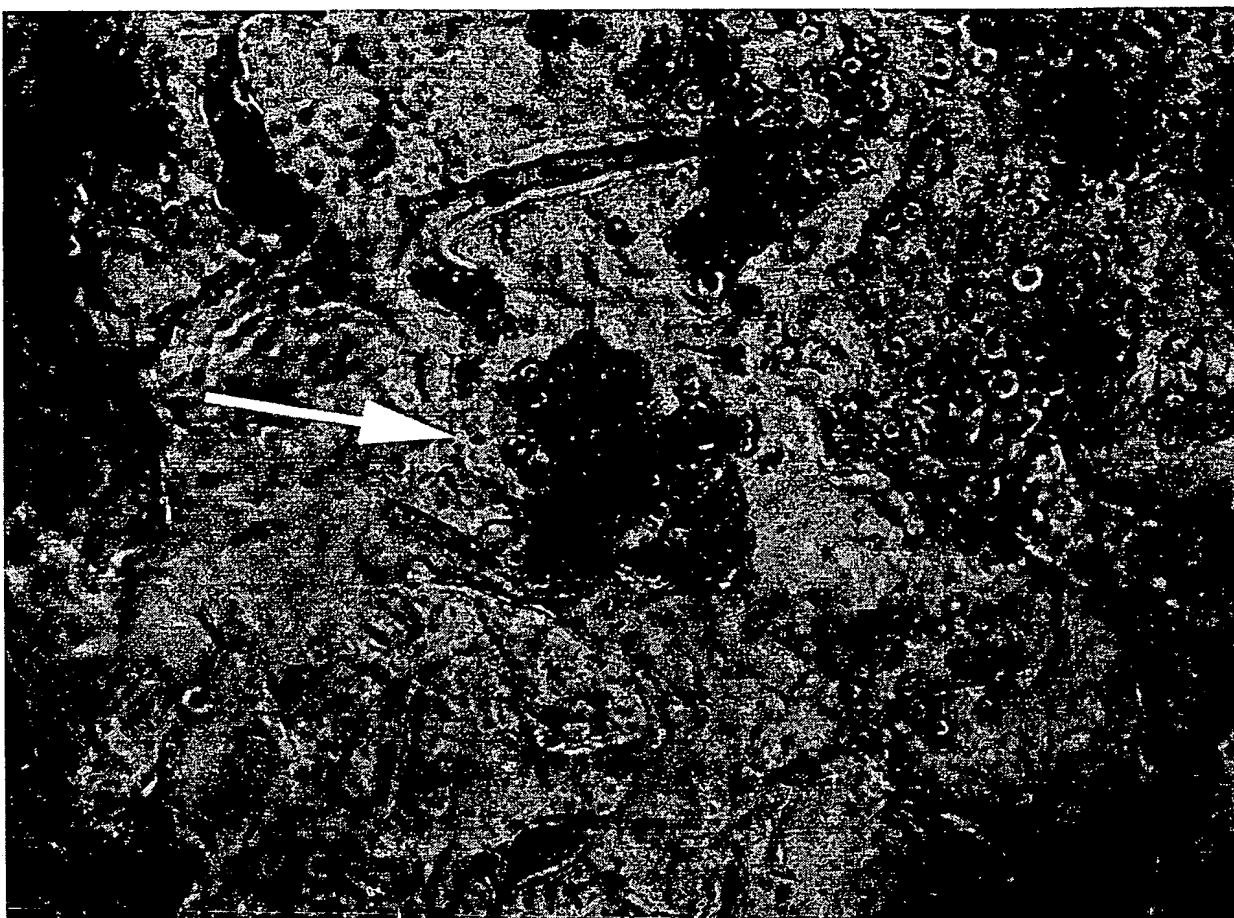


Fig. 3

BEST AVAILABLE COPY

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C08J9/28 A61L27/20 C12N5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C08J C08L C08B

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 199515 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1995-110731 XP002157156 "Making chitosan porous matter used e.g. for sepn. of mixed solns. - comprising cooling and freezing acidic aq. soln. of chitosan and drying by subliming water without thawing." &amp; JP 07 033902 A (LIGNYTE CO LTD), 3 February 1995 (1995-02-03) abstract</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1, 2, 5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 January 2001

Date of mailing of the international search report

24/01/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09809

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI  Week 199049  Derwent Publications Ltd., London, GB;  AN 1990-364546  XP002157157  "Prodn. of porous chitosan material for filters, etc. - by dissolving chitosan in aq. acid soln., freeze drying, neutralising etc."  &amp; JP 02 261838 A (SUMITOMO CEMENT CO.),  24 October 1990 (1990-10-24)  abstract</p> <p style="text-align: center;">----</p>	1,2,5
A	<p>DATABASE WPI  Week 199039  Derwent Publications Ltd., London, GB;  AN 1990-294670  XP002157158  "Porous carrier for cell culture - comprises high molecular substance having membrane partitioned micropores"  &amp; JP 02 207785 A (ASAHI CHEM IND CO LTD),  17 August 1990 (1990-08-17)  abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09809

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 7033902 A	03-02-1995	JP 2571887 B	16-01-1997
JP 2261838 A	24-10-1990	NONE	
JP 2207785 A	17-08-1990	NONE	

## INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09809

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C08J9/28 A61L27/20 C12N5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C08J C08L C08B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, EPO-Internal

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE WPI Week 199515 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1995-110731 XP002157156 "Making chitosan porous matter used e.g. for sepn. of mixed solns. - comprising cooling and freezing acidic aq. soln. of chitosan and drying by subliming water without thawing." &amp; JP 07 033902 A (LIGNYTE CO LTD), 3. Februar 1995 (1995-02-03) Zusammenfassung</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1,2,5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Januar 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

24/01/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mazet, J-F

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE WPI Week 199049 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-364546 XP002157157 "Prod'n. of porous chitosan material for filters, etc. - by dissolving chitosan in aq. acid soln., freeze drying, neutralising etc." &amp; JP 02 261838 A (SUMITOMO CEMENT CO.), 24. Oktober 1990 (1990-10-24) Zusammenfassung</p>	1,2,5
A	<p>-----</p> <p>DATABASE WPI Week 199039 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1990-294670 XP002157158 "Porous carrier for cell culture - comprises high molecular substance having membrane partitioned micropores" &amp; JP 02 207785 A (ASAHI CHEM IND CO LTD), 17. August 1990 (1990-08-17) Zusammenfassung</p> <p>-----</p>	8

# INTERNATIONALE RESEARCHERBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

nationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09809

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 7033902	A	03-02-1995	JP 2571887 B	16-01-1997
JP 2261838	A	24-10-1990	KEINE	
JP 2207785	A	17-08-1990	KEINE	